

**ISOLIERUNG DES PROTEOLYTISCHEN
ENZYMS AKROSIN AUS EBER-SPERMIEN UND
UNTERSUCHUNGEN AN SAURESTABILEN
AKROSININ-HIBITOREN IM
CERVIKALEN MUCUS**

Elisabeth Goebel

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Komm. Leiter: Prof. Dr. Hans Fritz

ISOLIERUNG DES PROTEOLYTISCHEN ENZYMS AKROSIN AUS EBER-
SPERMIEN UND UNTERSUCHUNGEN AN SÄURESTABILEN AKROSININ-
HIBITOREN IM CERVIKALEN MUCUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisabeth Goebel
aus
Essen

München 1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.1975



Meinen Eltern

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die Überlassung des
Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die wissenschaft-
liche Anleitung und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung und Zielsetzung

B Einführende Übersicht

C Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

I. Isolierung von Eberakrosin

1. Gewinnung und Extraktion der Spermien
2. Trennung des Akrosins von den Inhibitoren durch Gelfiltration
3. Affinitätschromatographie
 - a Theoretische Grundlagen
 - b Die Methode zur Reinigung von Eberakrosin an ABA-Cellulose
4. Stabilisierung des Akrosins

II. Hemmversuche mit cervikalem Mucus

1. Gewinnung des Cervixsekretes
2. Aufbereitung des Cervixsekretes
3. Hemmverhalten und Hemmspektrum
 - a Trypsin
 - α. Hemmtest mit Bronchialsekret
 - β. Hemmtest mit nativem Mucus
 - γ. Hemmtest mit säurebehandeltem Mucus
 - b Akrosin
 - α. Hemmtest mit Bronchialsekret
 - β. Hemmtest mit NaCl-Lösung
 - γ. Hemmtest mit Mucus

D Diskussion

I. Zur Isolierung von Akrosin

II. Zur Gewinnung von Mucus

III. Zum Hemmspektrum

IV. Schlußbemerkung

E Material und Methoden

I. Material

1. Enzyme

2. Substrate

3. Reagentien

4. Materialien für die Säulenchromatographie

II. Methodik

1. Enzymbestimmung

a Trypsintest

b Akrosintest

c Azocaseintest

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität

3. Gewinnung der Spermien und Vorbereitung zur Extraktion

4. Saure Extraktion

5. Einengung der Extrakte durch Gelfiltration
6. Gelfiltration über Sephadex G-75
7. Affinitätschromatographie
8. Entsalzung und Lyophilisierung
9. Gewinnung des cervikalen Mucus
10. Aufbereitung des Mucus

Einleitung und Zielsetzung

Bei der Suche nach verschiedenen Möglichkeiten für eine Kontrazeption ist es zuerst einmal notwendig, den Befruchtungsvorgang eingehend zu erforschen. Nach heutigen Kenntnissen ist kein biologisches Geschehen ohne Beteiligung von Enzymen vorstellbar. Daher hängt das Verständnis für alle biologischen Reaktionen unter anderem wesentlich von dem Wissen über Struktur und Wirkungsweise der diese Reaktionen katalysierenden Substanzen ab. Untersuchungen der an der Befruchtung maßgeblich beteiligten Enzymsysteme haben in den letzten Jahren genaueren Einblick in die biochemischen Reaktionsabläufe ermöglicht, die an der Vereinigung von Samen- und Eizelle beteiligt sind.

Schon seit etwa 40 Jahren ist bekannt, daß ein Teil dieser Enzyme aus Proteinasen besteht. 1930 isolierte Yamane (1,2) aus epididymalen Kaninchenspermien eine Hitze-labile Substanz, die er "Tryptase" nannte. Diese Substanz lockerte den follikulären Zellverband des Ovum, führte zu einer Dispersion der corona radiata-Zellen und löste so die Umhüllung des Eies auf (2). Buruiana (3) konnte eine solche proteolytische Aktivität auch in Spermien anderer Spezies nachweisen.

Waldschmidt, Hoffmann und Karg (4,5) zeigten zum ersten Mal, daß in Eberspermien ein proteolytisches Enzym vorhanden ist,

das synthetische Substrate für Trypsin, so z.B. N-~~α~~-tosyl-DL-argininmethylester (TAME) und N-~~α~~-benzoyl-DL-arginin- β -naphtylamid (BANA) hydrolysiert. Außerdem schlossen sie aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen, daß in den Sekreten der Ampulle und der Samenblase ein Inhibitor dieses "Trypsin-ähnlichen Enzyms" vorhanden sein müsse. Mit dem Sekret der Ampulle und einem aus Sojabohnen isolierten Inhibitor gelang ihnen nämlich eine Hemmung sowohl des Trypsin-ähnlichen Enzyms TLE als auch von Trypsin selbst (5).

Zwei Jahre später konnten Stambaugh und Buckley nachweisen (6,7,8), daß das TLE, welches in der Akrosomenkappe von Kaninchen-, Affen- und Menschenpermien lokalisiert ist, sowie Trypsin selbst die Zona pellucida des Eies auflösen. Zum Nachweis des TLE in der Akrosomenkappe wurden Spermien homogenisiert und in Schwanz-, Mittel- und Kopfteil mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Akrosomenkappe wurde von der Kopffraktion abgelöst und der Inhalt durch Behandlung mit Detergentien aufgelöst. Haendle et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen (9). Gaddum und Blandau (10,11) beschrieben 1970 die proteolytische Wirkung von Spermien verschiedener Spezies auf Gelatinemembranen. In Anwesenheit von Trypsin-Inhibitoren wird auch hier die lytische Aktivität drastisch herabgesetzt (12).

Während der letzten vier Jahre wurde die Bedeutung dieses

"Trypsin-ähnlichen Enzyms" beim Befruchtungsvorgang in einer Reihe eindrucksvoller Arbeiten untersucht (Zaneveld et al. 13, 14,15,16). Es gelang die Isolierung dieses Enzyms, das nach seinem Vorkommen in der Akrosomenkappe des Spermiums von Zaneveld "Akrosin" genannt wurde. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß der entscheidende Schritt beim Eindringen des Spermiums in das Ovum dieser Protease zugeschrieben werden muß. Weiterhin konnten aus dem Spermaplasma von Säugetieren Protein-Proteinase-Inhibitoren isoliert werden, die Akrosin hemmen (17,18,19), und denen eine wichtige Funktion bei der Inaktivierung des Akrosins im männlichen Genitaltrakt zukommt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich besonders mit der Frage, ob im cervikalen Mucus, ähnlich wie im Seminalplasma, ebenfalls Akrosininhibitoren zu finden sind.

Einführende Übersicht

1. Grundlegende Begriffe

Die Bildung der Spermien erfolgt in den Testes, ihre Speicherung in der Epididymis (epididymale Spermien). Bei der Ejakulation wird den epididymalen Spermien unter anderem das Sekret der Vesikulardrüsen beigemischt (ejakulierte Spermien). Die in der Vagina (bei manchen Säugern auch direkt im Uterus) abgelagerten Spermien wandern durch Cervix und Uterus, bis sie nach vier bis acht Stunden die Ampulle des Eileiters erreichen. Erst jetzt sind die Spermien befruchtungsfähig, sie sind kapazitiert und können die Zona pellucida des Eies durchdringen (20,21,22,23). Die Geschwindigkeit dieses physiologischen Reifungsprozesses ist abhängig vom endokrinen Funktionszustand des weiblichen Genitaltraktes: Unter Progesteroneinfluß wird die Kapazitisierung der Spermien fast völlig unterbunden, unter Östrogeneinfluß dagegen wird die Kapazitisierungszeit stark herabgesetzt (20,22). Morphologische Veränderungen der Spermien durch die Kapazitisierung sind nicht erkennbar (20,23). Epididymale und ejakulierte Spermien, die nicht eine gewisse Zeit im weiblichen Genitaltrakt (Uterus oder Eileiter) verweilten, sind also nicht befruchtungsfähig. Es können aber auch bereits kapazitierte (befruchtungsfähige) Spermien wieder dekapazitiert werden, wenn man sie mit Seminalplasma in Kontakt bringt (24,25).

2. Morphologie und Biochemie von Spermium und Ovum

Am Kopf des Spermiums sitzt die sogenannte Akrosomenkappe, in der unter anderem folgende Enzyme lokalisiert sind: Hyaluronidase (6,7), eine Spermien-Neuraminidase (28), ein "corona penetrating enzyme" (CPE) (29,30), sowie das Akrosin (6,16, 13), eine Protease mit Trypsin-ähnlicher Spezifität, auch "trypsin like enzyme" (TLE) genannt.

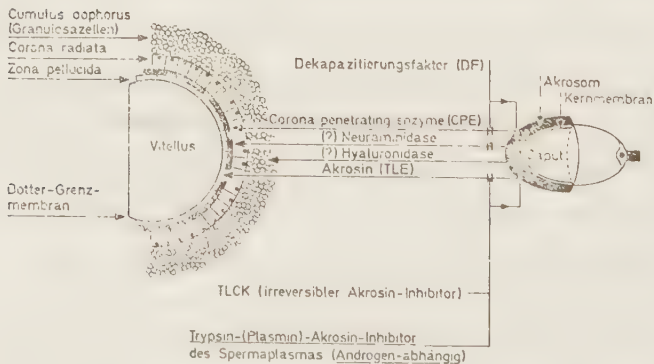


Abb.1 Schematische Darstellung von Ovum und Spermium mit den Penetrationsenzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren nach Fritz et al. (60).

Diese Enzyme befähigen das Spermium, die das Ei umgebenden Zellschichten und Membranen zu durchdringen.

Die äußere Begrenzung dieser Hüllen bilden die Granulosazellen in Form eines dicken, lockeren Zellaggregats (cumulus oophorus). Daran schließt sich eine wesentlich dünnere Schicht von corona radiata Zellen an, die direkt auf der Zona pellucida aufsitzen, welche die widerstandsfähigste Hülle in Form einer Mukoproteinmembran darstellt (31). Die innere Begrenzung bildet die Vitellus Membran.

Beim Kontakt des Spermiums mit der Membranoberfläche der Zona pellucida kommt es zur sogenannten Akrosomenreaktion: Dabei löst sich die Akrosomenmembran in kleine Bläschen auf, wobei die im Akrosom enthaltenen Enzyme frei werden (20,23) und durch ihre lytische Wirkung dem Spermium den Weg durch die Zona pellucida bahnen. Das Spermium durchdringt nun ohne seine Akrosomenkappe die Zona pellucida (20,23). Nur kapazitierte Spermien sind zu dieser Akrosomenreaktion fähig.

3. Corona penetrating enzyme (CPE) und Dekapazitierungsfaktor (DF)

CPE ist eine Substanz wahrscheinlich enzymatischer Natur, die im Extrakt aus Akrosomen der Spermien gefunden wurde. Zaneveld et al. (29) gelang am befruchteten Kaninchenei der Nachweis, daß CPE eine vollständige Dispersion der corona radiata Zellen

bewirkt. Wahrscheinlich werden durch CPE nur interzelluläre Bindungen gelöst, da die Corona radiata Zellen auch nach der Dispersion noch unverändert lebensfähig sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Spermien die Interzellularräume passieren und nicht die Zellen selbst durchdringen. Die Zona pellucida wird durch CPE nicht angegriffen.

Zaneveld et al. (16) isolierten aus Seminalplasma einen Hemmstoff, den sogenannten Dekapazitierungsfaktor (DF), vermutlich ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht von etwa 500, der die dispergierende Wirkung von CPE aufhebt (32). In seiner Gegenwart werden kapazitierte Spermien dekapazitiert; sie sind dann nicht mehr fähig, die Corona radiata Zellschicht zu durchdringen. Die Abtrennung des DF sowie der Akrosininhibitoren aus den ejakulierten Spermien könnte zumindest ein wichtiger Teilschritt des Kapazitierungsvorganges sein.

4. Akrosin (trypsin like enzyme: TLE) und Zona pellucida

Die Durchdringung der Zona pellucida des Eies gelingt dem Spermium mit Hilfe des Akrosins. Folgende Befunde sprechen für diese Annahme:

a) Auch Trypsin, das dem Akrosin in seiner Wirkungsspezifität sehr ähnlich ist, vermag die Zona pellucida aufzulösen (33). Der Vergleich folgender Eigenschaften beider Enzyme spricht

für eine Trypsinähnlichkeit des Akrosins: Molekulargröße, pH-Optimum, Spaltung von BAEE und BAPA, Hemmung der Enzymaktivität durch synthetische Trypsininhibitoren wie TLCK und DFP sowie durch eine Reihe natürlich vorkommender Trypsininhibitoren (13).

b) Die Trypsininhibitoren aus Limabohnen und Sojabohnen (26) sowie die Inhibitoren aus Meerschweinchen Samenblasen (9) vermögen die durch akrosomale Spermienextrakte bedingte Auflösung der Zona pellucida nahezu vollständig zu hemmen.

c) Durch Inkubation kapazitierter Spermien mit Trypsininhibitoren wird deren Befruchtungsfähigkeit im Vergleich zu kapazitierten, nicht mit Inhibitor behandelten Spermien, drastisch herabgesetzt (13).

5. Akrosininhibitoren

Ursprünglich wurden sie als Trypsininhibitoren 1965 von Haendle et al. (34,35) und unabhängig davon 1966 von Waldschmidt et al. (5) entdeckt. Sie kommen in den Vesikulardrüsen, aber auch im Sperma der Säugetiere (34,36) und in geringer Konzentration auch in epididymalen Sekreten vor und hemmen außer Trypsin auch Akrosin. Die Hemmung ist reversibel, das heißt der inaktive Enzym-Inhibitor-Komplex dissoziiert unter geeigneten Bedingungen wieder in seine aktiven Einzelkomponenten.

Zaneveld et al. (16,13,37) fanden, daß nur die akrosomalen Extrakte epididymaler und kapazitierter Spermien eine hohe Akrosinaktivität aufweisen, während die Extrakte frisch ejakulierter Spermien keine oder nur sehr geringe BAEE-spaltende Aktivität zeigten. Wurden letztere jedoch an DEAE-Cellulose chromatographiert, so konnte man eine relativ hohe Akrosinaktivität nachweisen. Vermutlich wird bei diesem Reinigungsschritt ein Hemmstoff vom Akrosin abgetrennt. Demnach liegt Akrosin in den akrosomalen Extrakten ejakulierter Spermien reversibel an einen Hemmstoff gebunden als Akrosin-Inhibitor-Komplex vor. Nach neuesten Erkenntnissen liegt die Vermutung nahe, daß die Akrosin-Inhibitoren beim Befruchtungsvorgang eine wichtige Rolle spielen.

Bei der Ejakulation kommen sie in Kontakt mit den epididymalen Spermien. Durch die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes wird die proteolytische Aktivität des Enzyms aufgehoben. Bei der Kapazitisierung im weiblichen Genitaltrakt wird dann auf bisher nicht bekannte Weise der Akrosin-Inhibitor-Komplex dissoziiert. Erst jetzt ist das Akrosin wieder voll funktionsfähig, die Spermien sind kapazitiert.

Man vermutet hinter der Existenz der Proteaseinhibitoren im Spermaplasma, Cervixsekret sowie anderen Sekreten genitalen Ursprungs eine Schutzfunktion. Sehr viele Spermien verlieren während ihres Verweilens im weiblichen Genitaltrakt ihre Akrosomenkappe, was Bedford (20,23) die "zufällige" Akrosomenre-

aktion nennt. Das dabei frei werdende hohe proteolytische Potential wird durch die Inhibitoren wirksam blockiert. Dadurch wird unter Umständen eine Schädigung der Schleimhautzellen, intakter Spermien und anderer Zellen verhindert. Darüber hinaus ist bekannt, daß kapazitierte Spermien leicht von Leukozyten phagozytiert werden. Vielleicht verhindern die Hemmstoffe auch die Phagozytose.

6. Cervikaler Mucus

Die Kenntnis vom Vorhandensein der Proteaseinhibitoren im Seminalplasma führt zu der berechtigten Frage, ob ähnliche Inhibitoren auch im cervikalen Mucus anzutreffen sind.

Der Cervikalkanal besitzt etwa 100 Schleim produzierende, drüsenähnliche Ausstülpungen, Krypten genannt, die durchschnittlich 20 - 60 mg Mucus pro Tag sezernieren, kurz vor der Ovulation sogar bis zu 700 mg (38).

Der cervicale Mucus besteht zu ca. 92 - 95% aus Wasser, zu 1% aus anorganischen Salzen (davon 0,7% NaCl). Außerdem sind Spuren von K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Phosphaten, Sulfaten und Bicarbonat vorhanden. Der wichtigste Bestandteil des cervikalen Mucus ist ein Hydrogel, das aus Glykoproteinen vom Mucin Typ besteht. Biochemische Untersuchungen haben bewiesen, daß das cervikale Mucin ein fibrilläres System darstellt, bestehend aus supramolekularen Verbindungen von Glykoproteinen. Verän-

derungen von Struktur und Viskosität dieser Makromoleküle sind verantwortlich für die periodische Durchdringbarkeit bzw. Nichtdurchdringbarkeit des cervikalen Sekretes durch das Spermium. Dieser Vorgang wird hormonell gesteuert. Unter Östrogeneinfluß wird dünner, wässriger, alkalischer, zell- armer Schleim produziert, der von den Spermien leicht passiert wird. Unter Progesteronwirkung wird der Mucus viskös und zell- reich und für Spermien undurchdringbar.

7. Proteinaseinhibitoren im cervikalen Mucus

1966 berichten erstmals Haendle et al. (39) über das Vorkommen eines Trypsininhibitors im Cervixsekret der Frau.

Das menschliche Cervixsekret enthält neben den Proteinaseinhi- bitoren aus dem Serum einen weiteren säurestabilen Proteinase- hemmstoff (40) mit dem Molekulargewicht von 11 500. Die Funk- tion dieses Inhibitors ist bisher unbekannt. Folgende Überle- gungen über den biologischen Sinn dieses Inhibitors werden an- gestellt:

1. Die Struktur des Mucus wird dadurch geschützt, denn es ist bekannt, daß der Mucus durch Inkubation mit proteolytischen Enzymen seine typischen rheologischen Eigenschaften verliert. In der Tat wurde bisher kaum proteolytische Aktivität im cer- vikal Mucus beobachtet.

2. Moghissi et al. (41,42) erforschten die Funktion der proteolytischen Enzyme beim Passieren der Spermien durch den cervikalen Schleim. Sie berichteten über die Isolation einer menschlichen Seminalprotease, die dem Chymotrypsin sehr ähnlich ist. Dieses Enzym vermindert die Viskosität des Mucus und beschleunigt den Durchtritt der Spermien, ähnlich dem käuflichen Chymotrypsin. Ein Chymotrypsin-Inhibitor im cervikalen Mucus, wie z.B. das α_1 -Antitrypsin, könnte die seminalen proteolytischen Enzyme hemmen. Bisher steht noch offen, ob das α_1 -Antitrypsin oder andere Inhibitoren des Cervix-Mucus wirklich Inhibitoren für seminale Proteasen sind.

Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

I. Isolierung von Eberakrosin

1. Gewinnung und Extraktion der Spermien

Ejakuliertes, mit Konservierungslösung verdünntes Ebersperma, welches normalerweise zur künstlichen Insemination verwendet wird, zeigt keine Spaltungsaktivität gegen BAPA. Zuerst muß das Akrosin aus der Akrosomenkappe herausgelöst werden. Die Spermien werden in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 90 Minuten lang bei 4 000 U/min abzentrifugiert, das Sediment wird gesammelt. Aus dem Überstand kann der Seminalinhibitor gewonnen werden. Das Sediment wird drei mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen (durch jeweiliges Suspendieren und Zentrifugieren), wobei der gesamte Inhibitor entfernt wird. Die Extraktion des Akrosins aus dem Spermis sediment erfolgt mit 2% Essigsäure, die mit 2 N HCl auf pH 1,8 eingestellt worden ist (5 min suspendieren). Bei diesem Vorgang wird die Akrosomenkappe zerstört und somit Akrosin freigesetzt. Der essigsaure Extrakt zeigt eine milchige Trübung, welche bei hoher g-Zahl abzentrifugiert wird (18 000 U/min, 4°C, 100 min). Der klare Überstand wird in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Membran UM-10, Druck 5 atm) auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeengt.

2. Trennung des Akrosins von den Inhibitoren durch Gelfiltration

Der so gewonnene, essigsäure, konzentrierte Extrakt wird mittels Gelfiltration an Sephadex G-75 weitergereinigt. Gleichzeitig wird bei diesem Schritt der ebenfalls vorhandene Trypsin-Akrosin-Inhibitor vom Enzym getrennt.

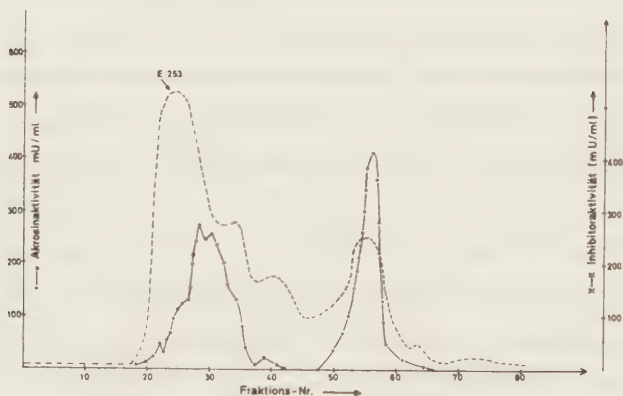
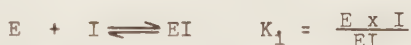


Abb.2 Gelfiltration an Sephadex G-75

Säule: 130 x 5 cm, Plastikmaterial,
gekühlt (40 C)
Elutionsmittel: 2%ige Essigsäure, pH 1,8
Elutionsgeschwindigkeit: ca. 30 ml/h
Elutionsvolumen pro Glas: ca. 8 ml

Für die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes gilt folgendes Gleichgewicht:



Im neutralen Medium (pH 7 - 9) sind die Dissoziationskonstanten K_1 extrem klein. Eine Verschiebung des pH-Wertes ins Alkalische, besonders aber ins Saure verschiebt das Dissoziationsgleichgewicht zu Gunsten der Einzelkomponenten. Zur Abtrennung des Inhibitors vom Akrosin wird deshalb eine Gelfiltration im sauren Milieu vorgenommen. Als für präparative Zwecke besonders geeignet erwiesen sich Sephadex G-75 und 2%ige (v/v) Essigsäure als Elutionsmittel (44). Die nach diesem Schritt erhaltene Inhibitor-freie Akrosinlösung weist eine spezifische Aktivität von bis zu 2 U/mg Protein (Substrat: BAPA) auf. Die Trennung der Enzym- von der Inhibitorfraktion ist auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte möglich (Inhibitor: MG ca. 13 000, Akrosin: MG ca. 56 000). Sephadex G-75 wirkt bei der Fraktionstrennung als Molekularsieb.

3. Affinitätschromatographie

a. Theoretische Grundlagen

Die zur Reinigung von Proteinen seit langem benutzten Verfahren, wie z.B. die Gelchromatographie und die Ionenaustauschchromatographie, fraktionieren die Substanzen nach ihren unterschiedli-

chen Molekülgrößen bzw. ihrer unterschiedlichen Ladung. Das Auflösungsvermögen beider Verfahren ist begrenzt durch den Anteil an Fremdprotein ähnlicher Ladung und ähnlicher Molekülgröße im Ausgangsmaterial.

Die Affinitätschromatographie dagegen nutzt hochspezifische Eigenschaften biologisch aktiver Moleküle zu deren Isolierung: Ihre Antigenität, Substratspezifität oder Hemmspezifität. Das Prinzip dieser Trennmethode besteht nun darin, daß ein Reaktionspartner der zu isolierenden Substanz, z.B. ein Antikörper, ein Inhibitor oder ein anderer spezifischer Rezeptor als Ligand an einen wasserunlöslichen Träger gebunden wird. An diesen unlöslichen Reaktionspartner werden nun die zu isolierenden Moleküle gebunden.

Beispiele zur Affinitätschromatographie

Ligand	Reaktionspartner
Enzym	Inhibitor
Inhibitor	Enzym
Antikörper	Antigen
Antigen	Antikörper

Soll ein Enzym isoliert werden, wie im vorliegenden Falle das Akrosin, so wird ein möglichst spezifischer Inhibitor als Ligand verwendet.

Die Säule wird mit dem Addukt Matrix-Inhibitor gefüllt und dann

mit der enzymhaltigen Lösung beschickt. Dazu werden Bedingungen gewählt, unter denen das Gleichgewicht der Reaktion $E + I \rightleftharpoons EI$ weitgehend auf der Seite des Komplexes liegt. Auf diese Weise wird das Enzym gebunden, während inaktives Protein die Säule passiert. Die Elution des Enzyms erfolgt durch Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes in Richtung der Einzelkomponenten, z. B. durch Veränderung der Ionenstärke, des pH-Wertes oder durch Zusatz eines kompetitiven Inhibitors zum Elutionspuffer.

Folgende Anforderungen sollten sowohl die Trägerharze als auch die Liganden erfüllen:

1. Es darf keine unspezifische Wechselwirkung zwischen der unlöslichen Matrix und dem zu isolierenden Protein stattfinden.
2. Die Trägermatrix soll ein mechanisch stabiles, poröses Netzwerk bilden, welches einen leichten Durchtritt von Makromolekülen gestattet und günstige Durchflußeigenschaften aufweist.
3. Die chemische Struktur der Matrix soll eine einfache Bindung des Liganden unter relativ milden Bedingungen und guter Ausbeute erlauben.
4. Die Bindung zwischen Ligand und Matrix soll den Bedingungen der Adsorption und Elution standhalten.

Diese Anforderungen erfüllen in unterschiedlicher Weise Cellulose, Agarose und Polyacrylamid.

- a. Reinigung von Eberakrosin unter Verwendung von p-Aminobenzamidin-succinylaminohexyl-Cellulose (ABA-SAH-Cellulose)

Benzamidin ist ein guter Hemmstoff für Akrosin (45) und gegen-

über extremen Bedingungen relativ unempfindlich. An einen Träger gebunden hat es sich als spezifisches Adsorbans für Akrosin bewährt.

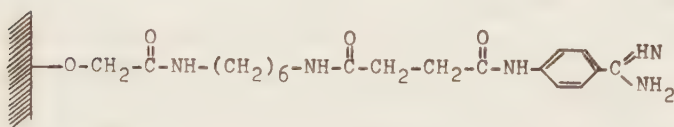


Abb.3 p-Aminobenzamidin-succinylamino-hexyl-Cellulose

Um lösliche Benzamidinanteile und Cellulosebestandteile aus dem Harz auszuwaschen, wird dieses mehrmals in Pufferlösung hoher Ionenstärke suspendiert und anschließend sedimentiert. Dies geschieht so oft, bis die Extinktion (280 nm) im Überstand (Benzamidin absorbiert bei 280 nm) der Extinktion des Waschpuffers entspricht. Im neutralen Milieu liegt das Gleichgewicht der Reaktion zwischen Akrosin und p-Aminobenzamidin auf der Seite des Komplexes. Deshalb wird die durch Gelfiltration gewonnene Inhibitor-freie Akrosinlösung neutralisiert und durch Zugabe von kristallinem Kochsalz auf 1 M Na⁺-Konzentration eingestellt. Dabei fällt zwischen pH 6 und 7 Protein aus, welches durch Zentrifugation entfernt wird. Die hohe Ionenstärke der Akrosinlösung soll beim anschließenden Vorgang der Adsorption verhindern, daß Fremdproteine oder Akrosin unspezifisch an geladene Gruppen

der ABA-SAH-Cellulose gebunden werden.

Die ABA-SAH-Cellulose wird in 0,1 M TRA/HCl-Puffer, der ebenfalls durch Kochsalz-Zugabe auf die Ionenstärke von 1 M gebracht wurde, äquilibriert und mit dem gleichen Volumen an - in demselben Puffer gequollenem - Sephadex G-25 versetzt. Die neutrale Akrosinlösung wird nun in dieser Mischung suspendiert und unter Kühlung (4°C) 2 Stunden lang gerührt und anschließend zentrifugiert. 10 - 20% der Akrosinaktivität verbleiben im Überstand. Dieser wird für weitere Experimente verwendet.

Die ABA-SAH-Cellulose (an die nun das Akrosin gebunden ist) wird in eine gekühlte Plastiksäule gefüllt. Diese wird mit 1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl Puffer, pH 3, äquilibriert und zwar so lange, bis im Eluat ein konstanter pH von 3,0 erreicht wird. Zur Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes, also zur Elution des Akrosins, wird der Puffer gewechselt, und zwar wird 0,1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl Puffer, pH 2,0, verwendet. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb.4.

4. Stabilisierung des Akrosins

Das Arbeiten mit Akrosin war bisher durch die Labilität des Enzyms sehr erschwert. So fanden Schießler et al. (45), daß Akrosin an aktiven Oberflächen, wie z.B. Glas, inaktiviert wird.

Von allen Substanzen, die als Stabilisatoren während der Lyo-

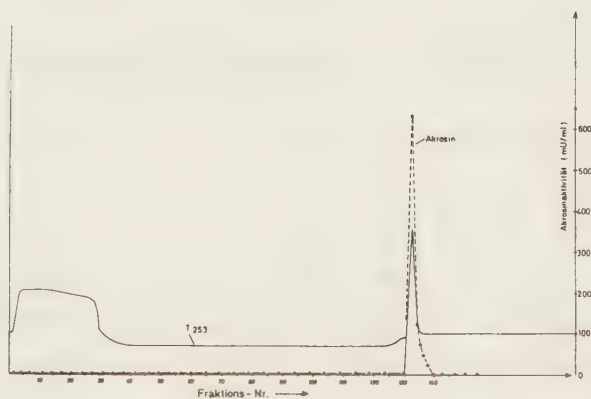


Abb.4 Elutionsdiagramm der Dissoziation
des Akrosin-Inhibitor-Komplexes
mit Hilfe von ABA-SAH-Cellulose

philisierung erprobt wurden, hat sich Saccharose in einer Konzentration von 1,5% (w/v) am besten bewährt. Die Entsalzung der bei der Affinitätschromatographie erhaltenen Enzymlösung erfolgt über eine Sephadex G-25-Säule, die mit 1,5% Saccharoselösung unter Zusatz von 1% Butanol als Bakteriostatikum entwickelt und äquilibriert wurde.

Die Akrosinaktivität wird so quantitativ von der Säule eluiert. Die salzfreie Fraktion wird in silikonisierten Glaskolben lyo-

phillisiert. Hierbei ist mit Aktivitätsverlusten zwischen 3 und 8% zu rechnen. Die Saccharose-Akrosin-Mischung weist auch nach monatelanger Aufbewahrung bei 4°C keine Aktivitätsverluste auf.

II. Hemmversuche mit cervikalem Mucus

1. Gewinnung des Cervixsekretes

Als Spenderinnen kamen nur Frauen im gebärfähigen Alter in Betracht, die sich am Anfang oder Ende ihres Zyklus befanden, um so den Zeitpunkt der Ovulation sicher auszuschließen. Während der gynäkologischen Untersuchung wurde das gelartige Cervixsekret mittels eines Plastikvenenkatheters und darauf aufgesetzter 20 ml-Spritze abgesaugt. Das so gewonnene Material wurde in einem Glaskolben bis zur weiteren Aufarbeitung bei -25°C eingefroren.

2. Aufbereitung des Cervixsekretes

Frische oder aufgetaute Proben des zähen Sekretes wurden mit derselben Menge physiologischer Kochsalzlösung verrührt und 30 min bei 0°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde unverändert oder nach Behandlung mit 1,5 bzw. 3,0%iger Perchlorsäure verwendet.

3. Hemmverhalten und Hemmspektrum

Zur Untersuchung des Hemmspektrums des nativen cervikalen Mucus erfolgte die Bestimmung der Hemmaktivität des Mucus gegenüber verschiedenen Enzymen nach bekannten Meßmethoden (s. Methodik).

Zuvor wurde der Mucus auf eigene enzymatische Aktivität untersucht. Er zeigt keine hydrolytische Spaltung von BAPA. Mit Hilfe des Azocaseintestes (s. Methodik) wurde die Wirkungsspezifität des Mucus ebenfalls geprüft, wobei sich keine proteolytische Aktivität nachweisen ließ.

a. Trypsin

α. Hemmtest mit nativem Mucus

Der cervikale Mucus hemmt die enzymatische Aktivität von Trypsin. Zur Untersuchung des linearen Zusammenhanges zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Trypsinaktivität und der Konzentration an Inhibitor wird eine definierte Menge Trypsin mit zunehmender Inhibitormenge (Abszisse) versetzt und die tryptische Restaktivität (Ordinate) des Enzyms gemessen. Aus der Abbildung ergibt sich eine Linearität bis zu einer Hemmung von ca. 60% des eingesetzten Trypsins. Siehe Abb.5.

β. Hemmtest mit säurebehandeltem Mucus

Da zur Charakterisierung eines Inhibitors seine Stabilität von großem Interesse ist, wurde die Säurefestigkeit des Mucus-Hemmstoffes untersucht. Bei der Behandlung des Mucus mit Perchlorsäure werden säurelabile Proteine denaturiert und der Niederschlag (bei 6 000 x g, 30 min, 0°C) abzentrifugiert (Näheres s. Methodik). Der klare Überstand wurde durch Zugabe von NaHCO_3 neutralisiert und mit dem so vorbehandelten Mucus der Trypsin-Hemmtest durchgeführt. Es wurde sowohl 3 wie 6%ige Perchlor-

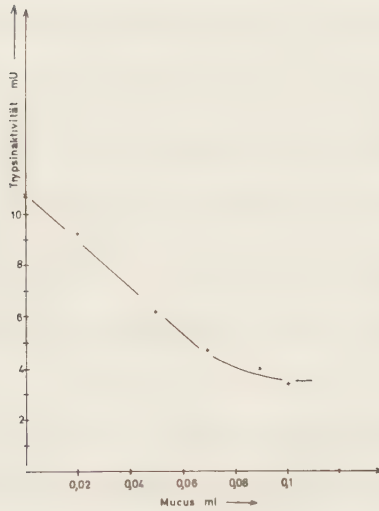


Abb.5 Titration von Trypsin mit nativem Mucus

säure verwandt. Beide Proben wiesen die gleiche Aktivität auf, was die Säurestabilität des Inhibitors beweist.

g. Trypsin-Hemmtest mit Bronchialsekret-Inhibitor

Um eine Referenzkurve zwischen bekannter Enzymaktivität von Trypsin und einem definierten Inhibitor zu erhalten, wurde das Hemmverhalten von Bronchialsekret-Inhibitor gegenüber Trypsin bestimmt. Dieser Inhibitor lag in lyophilisierter Form vor. Er wurde in TRA-Puffer gelöst und in steigender Menge zu Trypsin zugesetzt. Anschließend wurde das Substrat (BAPA) hinzugefügt. Die erhaltene Aktivitätskurve zeigt ein lineares Verhalten bis zu einer Hemmung von 70%. Siehe Abb.6.

b. Akrosin

Zur Bestimmung des Hemmverhaltens des Mucus gegenüber Akrosin wurde der gleiche Untersuchungsgang wie der zur Bestimmung der Trypsinaktivität unter Zusatz von Mucus durchgeführt.

α. Hemmtest mit Bronchialsekret-Inhibitor

Wie aus der folgenden Abbildung zu ersehen ist, wurden steigende Mengen an Bronchialsekret-Inhibitor jeweils mit TRA-Puffer auf 2 ml aufgefüllt, eine konstante Menge Akrosin zugefügt und nach Zusatz von 1 ml BAPA-Lösung die Reaktion gestartet. Bei dem abgebildeten Versuch war die Hemmung der Akrosinaktivität bis zu 50% Hemmung linear. Siehe Abb.7.

β. Hemmtest mit NaCl-Lösung

Um auszuschließen, daß die beim Verfahren der Verflüssigung und Aufbereitung des Gel-artigen Cervixsekretes angereicherten Salze

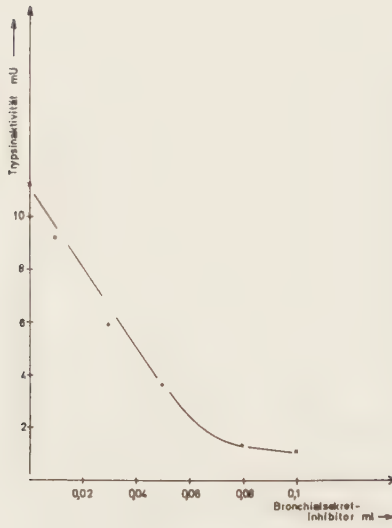


Abb.6 Titration von Trypsin mit
Bronchialsekret-Inhibitor

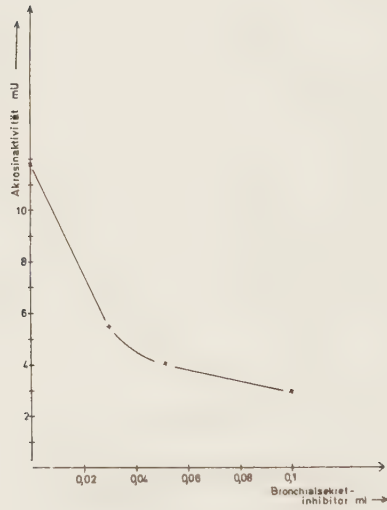


Abb.7 Titration von Akrosin mit
Bronchialsekret-Inhibitor

zu einer Hemmung des Enzyms Akrosin führen, wurde ein Leerver-
such in derselben Versuchsanordnung, aber ohne Mucoseinsatz
durchgeführt. Dies bedeutet, daß den Mucusproben entsprechende
NaCl-Volumina mit 6% HClO_4 versetzt, zentrifugiert, danach mit
 NaHCO_3 neutralisiert und auf pH 8,5 eingestellt wurden. Den
Mucosextrakten entsprechende Volumina wurden dann mit TRA-Puf-
fer auf 2 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde zu 0,1 ml Akrosin-
lösung pipettiert und dann 1 ml Substrat (BAPA) hinzugefügt.
Das Ergebnis zeigt, daß das Akrosin in diesem Gemisch nicht an
Aktivität verliert, also keine Hemmung des Enzyms eintritt. Es
war im Gegenteil eine geringe Aktivitätssteigerung zu verzeich-
nen, deren Ursache aus den durchgeführten Versuchen nicht er-
klärbar erscheint. In jedem Falle konnte gezeigt werden, daß
die bei der Aufbereitung des Mucus angereicherten Salze keinen
inhibierenden Effekt auf das Akrosin ausüben. Siehe Abb.8.

8. Hemmtest mit nativem Mucus

Nach den eben beschriebenen Vorversuchen wurde dann der Einfluß
des Cervixmucus auf die Aktivität des Akrosins untersucht. Die
Versuchsanordnung entsprach wiederum den Bedingungen, unter de-
nen die Hemmung der Trypsinaktivität bestimmt wurde. Ansteigen-
de Mengen an Mucus wurden jeweils mit TRA-Puffer auf 2 ml auf-
gefüllt. Die Enzym- und Substratmenge blieb unverändert. Als
Resultat dieses Versuches ergab sich eine Hemmbarkeit des En-
zyms bis zu Werten von 33%, ein Ergebnis, das deutlich unter
den für die Trypsinhemmung ermittelten Werten lag. Siehe Abb.9.

Insgesamt zeigte sich also eine klare inhibitorische Eigenschaft des Mucus gegenüber Trypsin, während diese gegenüber Akrosin wesentlich geringer ausfiel. Es ergab sich dagegen kein Unterschied, ob nativer oder mit Perchlorsäure vorbehandelter Schleim getestet wurde.

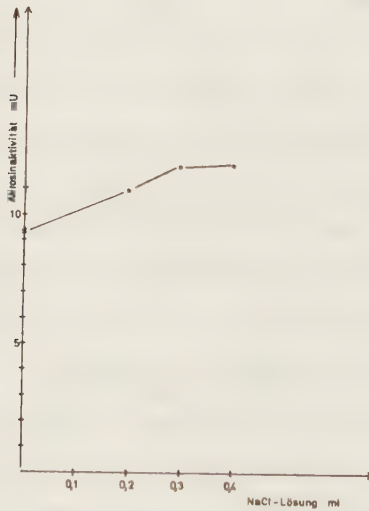


Abb.8 Titration von Akrosin mit Kochsalzlösung

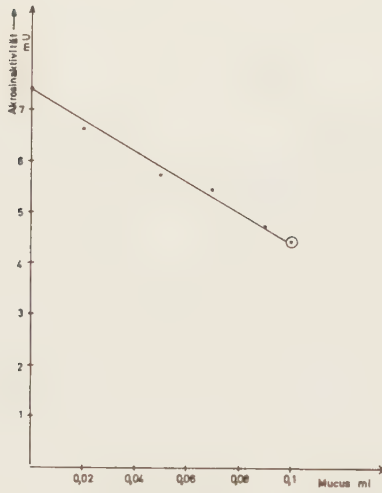


Abb.9 Titration von Akrosin mit nativem Mucus

Diskussion

I. Zur Isolierung von Akrosin

Um eine mögliche inhibitorische Eigenschaft des cervikalen Mucus auf Akrosin untersuchen zu können, war es zunächst einmal notwendig, dieses Enzym zu isolieren und möglichst rein darzustellen. Bisher war nur die Isolierung von Kaninchenakrosin mit konventionellen Methoden gelungen (46). Diese Verfahren hatten jedoch einige Nachteile. Einmal erwies sich das gewonnene Enzym als sehr instabil: Allein 80% der Aktivität gingen bei der pH-Änderung vom Säuren ins Neutrale verloren, und zum zweiten war es unmöglich, mit der beschriebenen Versuchsanordnung genügend Akrosin zu erhalten, um die vorliegenden Untersuchungen durchführen zu können. Erst die Arbeiten von Schleuning et al. (47,48) ermöglichten es, diese Schwierigkeiten zu überwinden. Diese Autoren entwickelten ein Verfahren, aus Ebersperma, das von der örtlichen Besamungsstation in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden konnte, mit Hilfe der Affinitätschromatographie genügend Akrosin zu isolieren und dieses zu charakterisieren. Das mit dem beschriebenen Verfahren gewonnene Enzym erfuhr auf dem Wege der Aufbereitung nur einen sehr geringen Aktivitätsverlust.

Die entscheidenden Verbesserungen zur Isolierung und Stabilisierung des Enzyms lagen in der Anwendung der Affinitätschromatographie und der Verwendung von silikonisierten Glasgefäßen, da sich herausgestellt hatte, daß das Akrosin an unbehandelten Glasoberflächen irreversibel adsorbiert wird (45). Die bisher ganz erheblichen Aktivitätsverluste bei der Anreicherung durch Lyophilisierung konnten durch Zusatz von 1,5% Saccharose auf 5 - 8% reduziert werden.

Außerdem stellte sich heraus, daß das Saccharose-Akrosin-Gemisch mehrere Monate lang unverändert haltbar war.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Akrosin-Aktivitäten unterschiedlich groß waren, je nachdem ob frisch ejakuliertes oder mit Konservierungsmittel versetztes Sperma aufbereitet wurde. Die mit 10% Glycerin konservierte und gelagerte Seminalflüssigkeit erbrachte eine wesentlich höhere Aktivitätsausbeute, eine Beobachtung, die auch von Schill (50) an menschlichem Sperma gemacht wurde.

Zur Erklärung dieses Unterschiedes bieten sich folgende Deutungen an: Der Zusatz von Glycerin könnte eine Veränderung der Akrosomenmembran bewirken, die durch die nachfolgende Behandlung in saurem Milieu vollständiger aufgebrochen wird und damit eine Freisetzung größerer Akrosinmengen erlaubt.

Andererseits könnte das Enzym auch in einer inaktiven Form als Proenzym (Zymogen) vorliegen, das nach Zugabe von Glycerin ak-

tiviert wird. Die einzelnen Schritte eines solchen Vorganges sind zwar für andere Enzyme, jedoch bisher nicht für Akrosin bekannt.

II. Zur Gewinnung von Mucus

Die Gewinnung von Mucus stellte sich als außerordentlich schwierig dar. Das Cervikalsekret wurde zwar, wie unter Material und Methode beschrieben, unter standardisierten Bedingungen mit einem Plastikkatheter mit aufgesetzter 20 ml-Spritze aus dem Cervikalkanal abgesaugt, jedoch gelang es nicht, gleichbleibende Mengen zu erhalten. Eine Beurteilung, wieviel des gesamten in der Cervix vorhandenen Mucus jeweils gewonnen werden konnte, war nicht möglich. Wie bereits einleitend erwähnt, unterliegt die sekretorische Tätigkeit der Cervikaldrüsen und damit auch Menge und Viskosität des Schleims den endokrinen Funktionsstadien während des Zyklus. Da eine genaue Bestimmung des Ovulationstermins bei den ambulant untersuchten Patientinnen nicht möglich war, mußte man sich darauf beschränken, den Mucus kurz vor oder nach der Menstruation ab-zuziehen. Der Zeitpunkt der Monatsblutung besagt aber nur, daß die Progesteronproduktion die der Östrogene übersteigt. Die absoluten Spiegel der weiblichen Sekualhormone konnten nicht bestimmt werden. Möglicherweise spielen diese aber für die Vis-

kosität und insbesondere für den Gehalt an Akrosin-Inhibitoren eine wesentliche Rolle. Eine physikalische Messung der Viskosität des gewonnenen Schleims war wegen der geringen Menge nicht durchführbar. Wenn aber Viskosität und der Gehalt an Akrosin-Inhibitoren im Mucus wichtige Faktoren für die gute oder schlechte Durchdringbarkeit des Schleimpfropfes für die Spermien sind, dann ist die Konzentration von Hemmstoffen zum Zeitpunkt des Eisprunges wohl die geringste. Deshalb wurde der Mucus auch zu einem Zeitpunkt gewonnen, der möglichst weit von der Ovulation entfernt lag.

III. Zum Hemmspektrum

In der vorliegenden Untersuchung ist gezeigt worden, daß cervical Mucus keine eigene proteolytische Aktivität besitzt. Andererseits enthält er mindestens einen, möglicherweise mehrere Inhibitoren gegenüber Proteinase. Haendle et al. (51) fanden einen Inhibitor gegen Trypsin und andere Enzyme, dessen Molekulargewicht zu etwa 2 000 bestimmt wurde. In einer neueren Arbeit konnten Wallner und Fritz (52) dieses Ergebnis nur insoweit bestätigen, daß zwar ein Hemmstoff gegen Trypsin und andere Proteinase im Cervikalsekret vorhanden ist, dieser jedoch ein Molekulargewicht von 11 500 aufweist. Ob es sich bei den nachgewiesenen Inhibitoren deshalb um ein und dieselbe Sub-

stanz handelt, die von Haendle et al. (51) durch die unterschiedliche Aufbereitung des Schleims u.U. in ein kleineres, aber offensichtlich immer noch aktives Bruchstück gespalten wurde, läßt sich nicht sicher beurteilen. Eine Isolierung und Strukturanalyse eines Inhibitors im cervikalen Mucus ist bisher noch nicht gelungen. Dies war auch nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Übereinstimmend mit den oben zitierten Literaturangaben konnte ein Inhibitor gegen Trypsin gefunden werden. Abbildung 5 zeigt, daß nativer und säurebehandelter Mucus die vorgelegte Trypsinaktivität bis zu 60% hemmt. Unsicherer wird die Interpretation der Akrosinhemmung durch den Schleim. In keinem dieser Versuche überstieg die Hemmung der Akrosinaktivität einen Wert von 33%, dessen Aussagekraft nicht eindeutig ist. Das Ausmaß der Akrosinhemmung durch Mucus lag weit unter den Hemmwerten für Trypsin, sowie den Ergebnissen der Kontrolluntersuchung mit dem bekannten Inhibitor aus Bronchialsekret gegenüber Akrosin. Die Frage, ob es sich also bei der geringen Akrosinhemmung durch cervikalen Mucus um eine unspezifische Aktivitätsänderung handelt, oder ob tatsächlich ein spezifischer Inhibitor für Akrosin im Mucus vorliegt, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Gegen die Existenz eines solchen Inhibitors sprechen jedenfalls die Untersuchungen von Wallner und Fritz (52), die in späteren Versuchen keine Hemmung von Akrosin durch Mucus fanden.

Allerdings ist zu bedenken, daß durch die Verflüssigung des Mucus mittels Ultraschall ein sehr labiler Akrosinhemmstoff eventuell unwirksam gemacht wird.

Wenn ein Inhibitor für Akrosin im Mucus vorhanden ist, läßt sich der flache Verlauf der Hemmkurve nur mit einer sehr gering vorliegenden Konzentration erklären, denn die verbleibende Aktivität von Akrosin im optischen Test ist quantitativ von der Menge des zugesetzten Inhibitors abhängig. Diese Beziehung entspricht im Prinzip vielen bekannten Enzym-Inhibitor-Systemen: Die Hemmung nimmt bei Zugabe steigender Mengen Inhibitor meist nur bis zu einem gewissen Hemmgrad linear mit der Inhibitormenge zu. Für eine 100%ige Hemmung ist in solchen Fällen ein Überschuß an Inhibitor erforderlich. Ein solcher Versuch war jedoch deshalb nicht durchführbar, weil auf Grund der bereits beschriebenen Schwierigkeiten nicht genügend konzentrierter Mucus zur Verfügung stand.

Schlußbemerkung

Die Angaben in der Literatur und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Existenz von Proteinaseinhibitoren im cervikalen Mucus. Unklarheit besteht jedoch weiterhin bezüglich des Molekulargewichtes und der Hemmspektren dieser Hemmstoffe. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Beziehung zwischen Enzymen und Inhibitoren im Mucus aufzuklären, insbesondere um die Funktion der Inhibitoren im cervikalen Mucus bei der Durchdringung des Zervikalpfropfes durch die Spermien zu verstehen. Wenn diese eindeutig bekannt ist, sollte es vielleicht möglich sein, in Zukunft etwa durch Herstellung von Akrosinantikörpern oder auch vaginale Applikation von synthetisch hergestellten Enzyminhibitoren neue Wege zur Kontrazeption zu beschreiten.

Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wird ein Verfahren beschrieben, das die Gewinnung und Reindarstellung größerer Mengen Akrosin aus Ebersperma ermöglicht. Die einzelnen Schritte zur Isolierung des Enzyms bestehen aus saurer Extraktion mit 2%iger Essigsäure, anschließender Gelfiltration über eine Sephadex G-75-Säule zur Abtrennung von Akrosininhibitoren und Affinitätschromatographie, durch die das Enzym rein dargestellt wird.

Der zweite Teil befaßt sich mit der Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften des Cervikalsekretes junger Frauen gegenüber Trypsin und dem gewonnenen Akrosin. Zum Vergleich wurde die Hemmung dieser beiden Enzyme durch den definierten Inhibitor aus Bronchialsekret bestimmt. Es wird festgestellt, daß der cervikale Mucus die enzymatische Aktivität von Trypsin reproduzierbar hemmt, und zwar hemmt 0,1 ml nativer Mucus 8,0 mU Trypsin. Dagegen fällt die Inhibierung der Akrosinaktivität durch Mucus deutlich geringer aus: 0,1 ml nativer Mucus hemmt maximal 3,7 mU Akrosin. Es wird diskutiert, ob es sich bei der Akrosinhemmung durch Mucus um die Funktion eines definierbaren Inhibitors oder einen unspezifischen Effekt handelt. Weiterhin wird die Bedeutung der vorliegenden Untersuchung für die Entwicklung einer möglichen Alternative zu den bisher bekannten Methoden der Kontrazeption erörtert.

Material und Methoden

I. Material

1. Enzyme

Trypsin (EC 3.4.4.4) Novo Industri Kopenhagen, 23,5 AE/g, 4365 NF/mg, krist., lyophil.; 5 mg in 100 ml 0,0025 N HCl lösen, bei 0 - 4°C zur Verhinderung der Autolyse aufbewahren.

2. Substrate

N α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid BAPA (53), Fa. E. Merck, Darmstadt; 100 mg BAPA in 100 ml deionisiertem Wasser bei 70 - 90°C lösen.

N α -Benzoyl-DL-lysin-p-nitroanilid-hydrochlorid BLNA (53), Fa. E. Merck, Darmstadt; 100 mg BLNA in 100 ml deionisiertem Wasser bei 70 - 90°C lösen.

Azocasein (53), Fa. Fluka AG, 2 g Azocasein unter Erwärmen (80°C) mit Phosphat-Puffer ad 100 ml lösen.

3. Reagentien (53)

Triäthanolamin-Puffer (0,2 M TRA, pH 7,8, 20 mM CaCl₂), EGA-Chemie; 18,6 g TRA und 1,47 g CaCl₂·2 H₂O in 450 ml deionisiertem Wasser lösen, mit 2 n NaOH auf pH 7,8 einstellen

und mit deionisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,6); 7,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,784 g KH_2PO_4 mit deionisiertem Wasser ad 500 ml lösen.

4. Materialien für die Säulenchromatographie

Sephadex G-75 und Sephadex G-25 Medium der Fa. Pharmacia-Chemicals, Uppsala, Schweden; p-Aminobenzamidinsuccinylamino-hexyl-Cellulose (Charge TA VI 382/3), Fa. E. Merck, Darmstadt;

II. Methodik

1. Enzymbestimmung

Definition der Enzymeinheit: 1 Enzymeinheit (U) setzt unter standardisierten Bedingungen 1 μMol Substrat pro Minute um (54).

Die Bestimmungen werden nach bekannten Methoden durchgeführt.

a. Trypsintest

Das Substrat BAPA wird durch Trypsin hydrolytisch gespalten. Die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilid wird am Photometer bei 405 nm gemessen (55,56,53,57).

Vergleichswertbestimmung: In einer 3 ml Glasküvette (OS 1.000 cm Schichtdicke) werden 0,2 ml (10 μg) Trypsinlösung mit Puf-

ferlösung auf 2 ml aufgefüllt. Die Reaktion, welche die Extinktionsänderung hervorruft, wird durch Zugabe von 1 ml (1 mg) BAPA-Substratlösung gestartet. Dabei bewirken 10 µg Trypsin eine Extinktionsänderung E von 0,0030/min bis 0,0036/min bei einem molaren Extinktionskoeffizienten für BAPA von $9,95 \times 10^3$ ($1/\text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Somit entspricht nach der Definition von Trautschold (58) 1 EmU ($1 \text{ EmU} = 10^{-3}$ Enzymeinheiten) einer Extinktionsänderung E von 0,00332/min.

b. Akrosintest

Die ausschließliche Verwendung von Plastik- bzw. silikonisiertem Glasmaterial ist Voraussetzung zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse (44,45).

BAPA- und BLNA-Test: Für die Spaltung dieser beiden Substrate durch Eberakrosin gelten gleiche Bedingungen. Die Freisetzung von p-Nitroanilin wird bei 405 nm am Eppendorf-Spektralphotometer verfolgt. Akrosin wird in die bei 25°C vorinkubierte Mischung aus Substrat und Puffer (0,2 M TRA, pH 7,8) pipettiert, wobei die enzymatische Reaktion gestartet wird (53). BAPA wird etwa 15-fach schneller hydrolisiert als BLNA.

c. Azocaseintest

Mit Hilfe der Azocaseinspaltung wird die Wirkungsspezifität eines Enzyms (z.B. Akrosin) als Endoproteinase ermittelt. Enzym und 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,6, sowie 2%iges Azocasein werden bei 30°C 10 Minuten inkubiert (Inkubationsvolumen 3 ml).

Durch Zugabe von 3 ml 5%iger Trichloressigsäure wird die Spaltung gestoppt. Dann wird bei Raumtemperatur zentrifugiert (10 min, 600 x g), in Küvetten filtriert und die Extinktionszunahme bei 366 nm gemessen (53).

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität

Definition der Inhibitoreinheit: 1IU (Inhibitor Unit) ist die Menge Inhibitor, die unter Standardbedingungen die Substratumsetzung um 1 μ Mol/min reduziert (55,58).

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wird eine konstante Menge des Enzyms mit steigendem Inhibitorgehalt bei 25°C in dem für den Enzymtest verwendeten Puffer 1 - 5 Minuten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Substratlösung gestartet. Die verbleibende Enzymaktivität wird nach obiger Methode bestimmt. Aus der Abnahme der Extinktionsänderung ΔE gegenüber dem Vergleichswert ohne Inhibitorzusatz (Leerwert) läßt sich der Inhibitorgehalt der Testlösung berechnen (58). Bei diesem Schritt wird die Substratumsetzung durch Enzymblockierung verzögert (55,60,58).

3. Gewinnung der Spermien und Vorbereitung zur Extraktion

Das Ebersperma wurde in der Prüf- und Besamungsanstalt München-Aubing e.V. gesammelt und unter Zusatz eines handelsüblichen Verdünners bei 4°C gelagert. Im Verlaufe von etwa 14 Tagen fie-

len jeweils etwa 6 l Sperma an, die später 90 Minuten lang bei 4°C und 600 x g zentrifugiert wurden. Das Sediment wurde insgesamt 5 Mal in jeweils 60 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und anschließend erneut zentrifugiert.

4. Saure Extraktion

Das auf diese Weise gewonnene Spermiensediment wurde mit 2%iger Essigsäure (mit 2N HCl auf pH 2,0 eingestellt) auf das 3-fache seines Eigenvolumens aufgefüllt, 15 Minuten suspendiert und anschließend 10 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugiert. Der milchig trübe Überstand wurde abdekantiert. Insgesamt wurde dieser Extraktionsvorgang 5 Mal wiederholt. Die gesammelten Extrakte wurden 100 Minuten bei 17000 x g zentrifugiert.

5. Einengung der Extrakte durch Ultrafiltration

Der essigsaurer Extrakt wurde durch Ultrafiltration (System Amicon, Membran UM 20E) bei 4°C im Verlaufe von etwa 6 Stunden auf 1/10 seines Ausgangsvolumens eingeengt.

6. Gelfiltration über Sephadex G-75

Säulenmaße: 130 x 5 cm, Elutionsmittel: 2% (v/v) Essigsäure; Die Säule wurde auf 4°C gekühlt. Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/h; Fraktionsvolumen: 7,5 ml. In der inhibitorfreien Fraktion

betrug die spezifische Aktivität des Akrosins bei Benutzung von BAPA als Substrat 2 U/mg Protein.

7. Affinitätschromatographie unter Verwendung von p-Aminobenzamidin-succinylaminohexyl-Cellulose

Es wurden gleiche Volumina feuchter ABA-SAH-Cellulose und gequollenen Sephadex G-25 in 1 M NaCl, 0,1 M TRA/HCl, pH 7,8 (NaCl-TRA-Puffer) suspendiert und anschließend in eine Säule (20 x 2 cm) gefüllt. Um eventuell vorhandene lösliche Bestandteile der Cellulose auszuwaschen, wurde die Säule kontinuierlich mit oben beschriebenem NaCl-TRA-Puffer durchgewaschen, und zwar so lange, bis die Transmission des eluierten Puffers bei 253 nm mit der Transmission des ursprünglichen Puffers übereinstimmte. Dann wurde die Mischung aus ABA-SAH-Cellulose und Sephadex G-25 wieder aus der Säule entfernt.

Die bei der Gelfiltration gewonnene essigsäure Akrosinlösung wurde im Volumenverhältnis 10:1 mit 1 M TRA/HCl Puffer, pH 7,8 versetzt und durch Zugabe von kristallinem Kochsalz auf eine Konzentration von 1 M NaCl gebracht. Dann wurde die Lösung mit 2 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Die zwischen pH 6 und pH 7 ausfallenden Proteine wurden abzentrifugiert (20 000 upm, 60 min). 30 g der mit NaCl-TRA-Puffer äquilibrierten ABA-SAH-Cellulose/Sephadex G-25-Mischung wurden in 150 ml dieser Lösung suspendiert, 2 Stunden bei 0 - 4°C schonend gerührt und

anschließend zentrifugiert.

Danach wurde das Sediment in eine gekühlte (2°C) Plastiksäule (20 x 2 cm) gefüllt. Diese Säule wurde mit 1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl-Puffer, pH 3,0 entwickelt, bis im Eluat bei 253 nm konstante Transmission und ein konstanter pH-Wert (3,0) gemessen wurden.

Elutionsgeschwindigkeit: 11 ml/h; Fraktionsvolumen: 5,5 ml;
Zur Elution des Akrosins wurde 0,1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl-Puffer, pH 2,0 verwandt.

8. Entsalzung und Lyophilisierung

Die Entsalzung der bei der Affinitätschromatographie gewonnenen Akrosinfraktionen erfolgte über eine gekühlte (2°C) Sephadex G-25-Säule (135 x 2 cm), äquilibriert mit 1,5% Saccharose, 1% (v/v) Butanol in deionisiertem Wasser.

Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/h; Fraktionsvolumen: 7,5 ml;
Die Saccharose enthaltende Akrosinlösung wurde in einem silikonisierten Glaskolben lyophilisiert.

9. Gewinnung von cervikalem Mucus

Das Cervixsekret wurde bei Patientinnen entnommen, die zur Routineuntersuchung die Ambulanz der I. Frauenklinik der Universität München aufsuchten. Die Patientinnen befanden sich alle im gebärfähigen Alter, am Anfang oder Ende ihres Zyklus,

um den Zeitpunkt der Ovulation möglichst sicher auszuschließen. Dem lag die Überlegung zugrunde, daß die Konzentration an Inhibitoren im cervikalen Mucus, die sich gegen Bestandteile des Spermiums richten, zum Zeitpunkt der Ovulation geringer sein müßte

Das Sekret wurde mittels eines Plastikkatheters und einer darauf aufgesetzten 20 ml Spritze direkt aus dem Cervixkanal abgesaugt. Blutig tingiertes Material wurde verworfen. Bis zur Aufarbeitung wurde das zähe Sekret in einem Glaskolben bei -25°C eingefroren. Die Ausbeute an Cervixsekret war spärlich, so daß die Zahl der Versuche zur Klärung der Eigenschaften beschränkt bleiben mußte.

10. Aufbereitung des Mucus

Das Material war in seiner Konsistenz recht unterschiedlich. Einige Proben waren so flüssig, daß sie ohne weitere Aufbereitung als nativer Mucus verwandt werden konnten.

In der Regel aber war das Material zäh und mußte zu weiteren Versuchszwecken erst aufgearbeitet werden. Das zähe Sekret wurde mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung verflüssigt und nach 5 Minuten heftigen Durchmischens 30 Minuten bei $6000 \times g$ und einer Temperatur von 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 3%iger Perchlorsäure versetzt und - wegen der dabei auftretenden Trübung -

erneut 30 Minuten lang bei 6000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit NaHCO_3 neutralisiert und mit Hilfe eines Teststreifens darüberhinaus auf pH 8,5 eingestellt. Die auf diese Weise erhaltene Mucoslösung wurde für die weiteren Untersuchungen verwandt.

Literaturverzeichnis

- 1 Yamane, J., Cytologia 1, 416 (1930);
- 2 Yamane, J., Cytologia 6, 474 (1935);
- 3 Buruiana, L.M., Naturwissenschaften 43, 523 (1956);
- 4 Karg, H., Waldschmidt, M. und Hoffmann, B., Kongress Trento 6. - 13.9.1964, Kongressberichte 3, 383 (1964);
- 5 Waldschmidt, M., Hoffmann, B. und Karg, H., Zuchthygiene 1, 15 (1966);
- 6 Stambaugh, R. and Buckley, J., Science 161, 585 (1968);
- 7 Stambaugh, R. and Buckley, J., J. Reprod. Fert. 19, 423 (1969);
- 8 Stambaugh, R. in: Biology of Mammalian Fertilization and Implantation (eds.: Moghissi and Hafez), Springfield, Ill., Verlag Charles C. Thomas;
- 9 Haendle, H., Ingrisch, H. und Werle, E., Klin. Wschr. 48, 824 (1970);
- 10 Gaddum, P. and Blandau, R.J., Science 170, 749 (1970);
- 11 Gaddum-Rosse, P. and Blandau, R.J., Am. J. Anat. 134, 133 (1972);
- 12 Fink, E., Fritz, H., Jaumann, E., Schiessler, H., Förg-Brey, B. and Werle, E., Protides of the Biological Fluids, 20th Colloquium, 425 (1973);
- 13 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Robertson, R.T. and Williams, W.L. in: Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (eds: Fritz and Tschesche), Munich, Nov. 1970, S. 236, Verlag Walter de Gruyter, Berlin;
- 14 Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T. and Williams, W.L., FEBS Letters 11, 345 (1970);

- 15 Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M. and Williams, W.L., J. Reprod. Fert. 25, 387 (1971);
- 16 Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.N. and Williams, W.L., J. Reprod. Fert. 20, 337 (1969);
- 17 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L. and Williams, W.L., Biol. Reprod. 6, 30 (1972);
- 18 Zaneveld, L.J.D., Dragoje, B.M. and Schumacher, G.F.B., Science 177, 702 (1972);
- 19 Schumacher, G.F.B., Contraception 4 (1971);
- 20 Bedford, J.M. in: Mammalian Reproduction (eds.: Gibian and Plotz), S. 124 (1970), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York;
- 21 Austin, C.R. in: Advances in Bioscience (ed.: Raspe), S. 5 (1970), Vieweg Verlag, Braunschweig;
- 22 Chang, M.C.: ebenda, S. 13;
- 23 Bedford, J.M.: ebenda, S. 35;
- 24 Williams, W.L., Robertson, R.T. and Dukelow, W.R.: ebenda, S. 61;
- 25 Chang, M.C., Nature 179, 258 (1957);
- 26 Dott, H.M., Dingle, J.T. and Fell, H.B. in: Lysosomes in Biology and Pathology, S. 230 (1969), North Holland Publishing Company, Amsterdam-London;
- 27 McLean, D. and Rowlands, J.W., Nature 150, 627 (1942);
- 28 Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.N. and Williams, W.L., Proc. Soc. exp. Biol. 133, 1172 (1970);
- 29 Zaneveld, L.J.D. and Williams, W.L., Biol. Reprod. 2, 363 (1970);
- 30 Zaneveld, L.J.D., McRorie, R.A. and Williams, W.L., Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28, 705 (1969);
- 31 Mintz, B., Science 138, 594 (1962);
- 32 Pinsker, M.C. and Williams, W.L., Arch. Biochem. 122, 111 (1967);

- 33 Chang, M.C. and Hunt, D.M., Exp. Cell Res. 11, 497 (1956);
- 34 Haendle, H., Fritz, H., Trautschold, I. und Werle, E., Z. physiol. Chem. 343, 185 (1965);
- 35 Fritz, H., Trautschold, I., Haendle, H. und Werle, E., Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 400 (1968);
- 36 Werle, E., Trautschold, I., Haendle, H. und Fritz, H., Ann. N.Y. Acad. Sci. 146 464 (1968);
- 37 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Foley, C.W. and Williams, W.L., Fed. Proc. 30, 2241 (1971);
- 38 Odeblad, E., Acta Obstet. Gynec. Scand. 45 (Suppl.2) 127 (1961);
- 39 Haendle, H. und Werle, E., Z. physiol. Chem. 349, 932 (1968);
- 40 Wallner, O. und Fritz, H., Z. physiol. Chem. 355, 709 (1974);
- 41 Moghissi, K., Dabich, S., Levine, T. and Neuhaus, O.W., Fert. Steril. 15, 15 (1964);
- 42 Moghissi, K. and Syner, F.N., Int. J. Fert. 15, 43 (1970);
- 43 Wunderer, G. in: Diplomarbeit, Technische Universität München, 1972;
- 44 Fink, E., Schiessler, H., Arnhold, M. und Fritz, H., Z. physiol. Chem. 353, 1633 (1972);
- 45 Schiessler, H., Fritz, H., Arnhold, M., Fink, E. und Tschesche, H., Z. physiol. Chem. 353, 1638 (1972);
- 46 Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D. and Williams, W.L., Biol. Reprod. 6, 23 (1972);
- 47 Schleuning, W.-D., Schiessler, H. und Fritz, H., Z. physiol. Chem. 354, 550 (1973);
- 48 Schleuning, W.-D. und Fritz, H., Z. physiol. Chem. 355, 125 (1974);
- 49 Fritz, H., Förg-Brey, B., Schleuning, W.-D. und Heimbürger, N., unveröffentlicht;
- 50 Schill, W.B., persönliche Mitteilung;

- 51 Haendle, H., Ingrisch, H. und Werle, E., Z. physiol. Chem. 351, 545 (1970);
- 52 Fritz, H., Trautschold, I. und Werle, E. in: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg.: H.U. Bergmeyer), S. 1021 (1970), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße;
- 53 Enzyme Nomenclature, Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1965;
- 54 Vogel, R., I. Trautschold und E. Werle in: Natürliche Proteinase Inhibitoren; Thieme Verlag, Stuttgart (1966);
- 55 Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961);
- 56 Nagel, W., Willig, F., Peschke, W., Schmidt, F.H., Z. physiol. Chem. 340, 1 (1965);
- 57 Trautschold, I. in: Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Universität München, 1965;
- 58 Fritz, H., Eckert, I., Werle, E., Z. physiol. Chem. 348, 1120 (1967);
- 59 Fritz, H., Hochstrasser, K. und Werle, E., Z. analyt. Chem. 243, 452 (1968);
- 60 Fritz, H., Fink, E., Marx, R. und Thiel, H.A. in: Sexualhormone und Blutgerinnung, XIV. Hamburger Symposium über Blutgerinnung, 21. und 22. Mai 1971, S. 33 - 48, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York;

Lebenslauf

Am 21.9.1946 wurde ich als 2. Kind des Diplom-Kaufmanns Albert Peters und seiner Ehefrau Maria, geb. Haas, in Essen geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Gauting kam ich 1957 in das Realgymnasium von Tutzing, wo ich im Juni 1966 das Abitur bestand. Im WS 1966/67 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1969, das Medizinische Staatsexamen im Dezember 1972. Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich in der Chirurgischen Universitätsklinik und der Medizinischen Poliklinik der Universität München. Seit September 1974 bin ich als wissenschaftliche Assistentin im Institut für Anästhesiologie der Universität München. Seit 28. Februar 1975 bin ich mit Dr. med. Frank-D. Goebel verheiratet.

